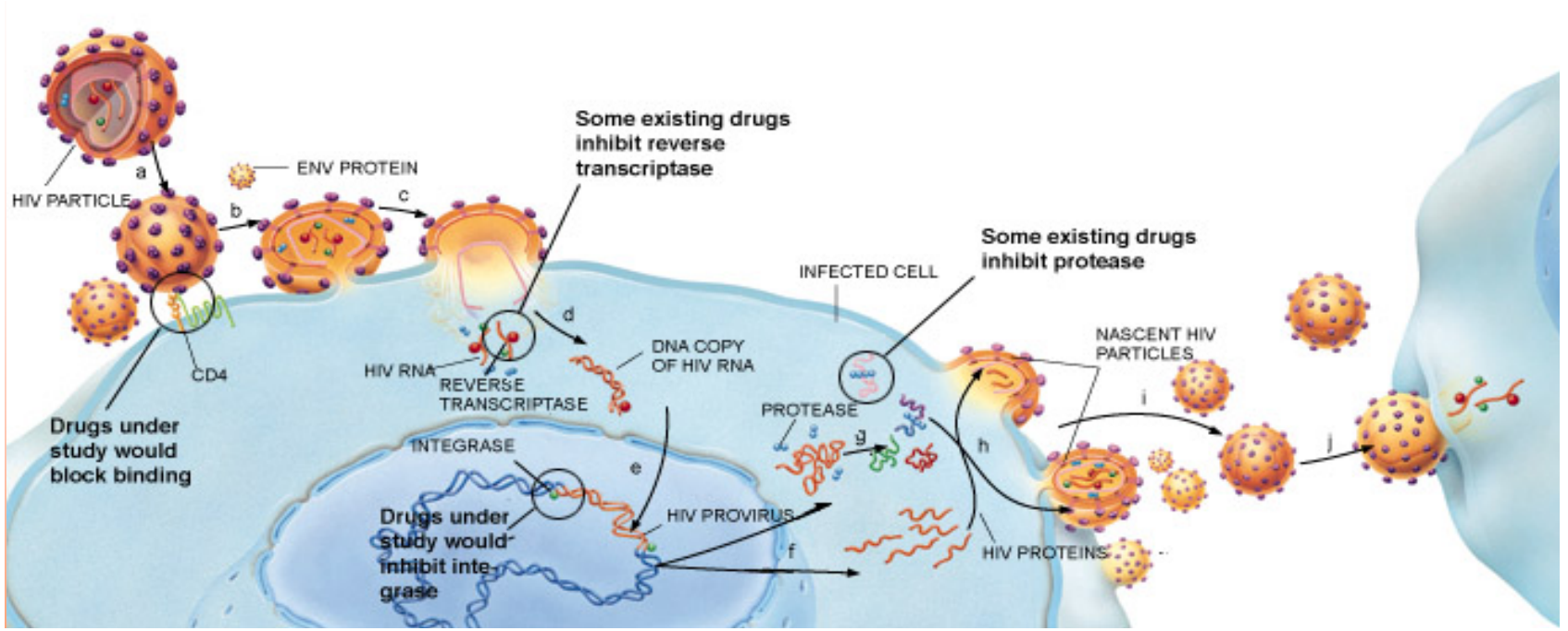
Aplicaciones de la Citometría de Flujo en la Práctica Clínica

Cuantificación de Linfocitos T CD4+ en pacientes HIV+

Bioquímica Carolina Carrara

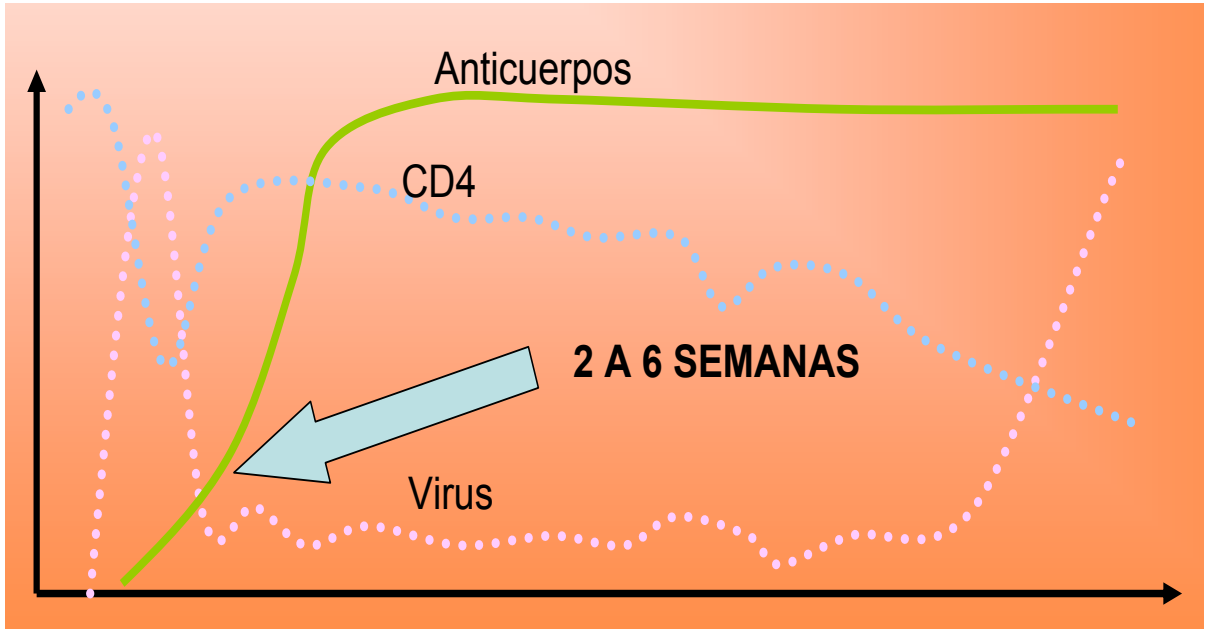
HIV-CD4+

- El Virus de Inmunodeficiencia Humana, es un virus que infecta los linfocitos T CD4+ del sistema inmune, utilizando este receptor de la células para ingresar a ellas, inserta su información genética, utilizar la maquinaria celular para multiplicarse y luego diseminarse a otras células CD4+.



Pruebas de Laboratorio

- Diagnóstico



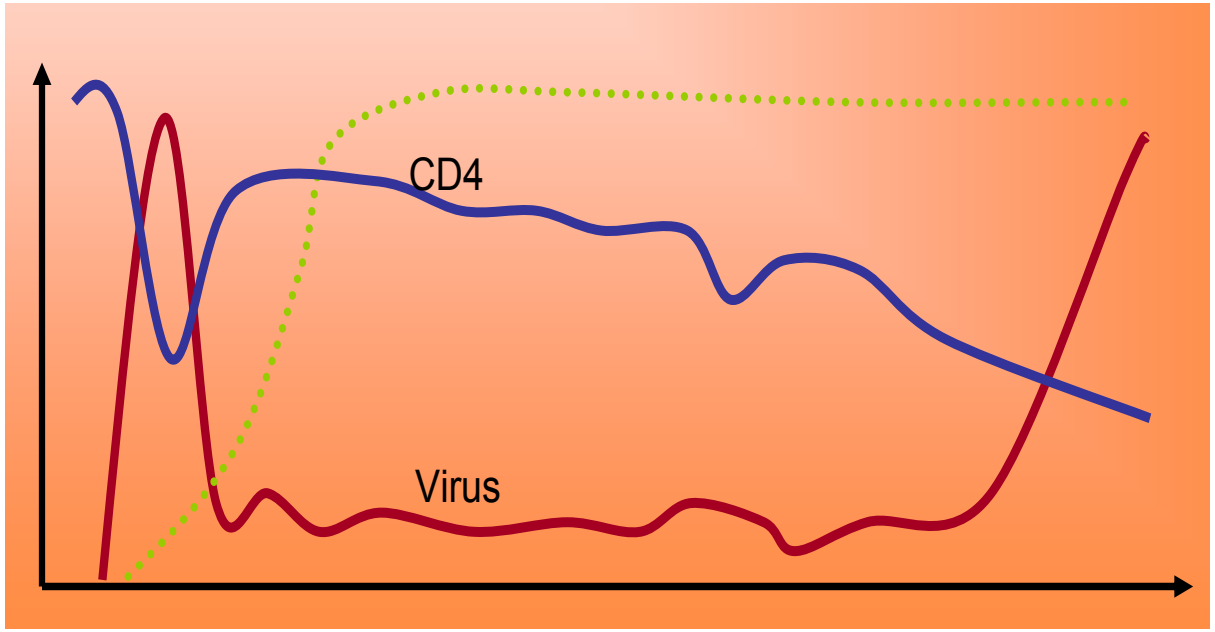
Pruebas Serológicas
(ELISA de cuarta generación)

Carga Viral
(Biología Molecular)

Recuento de CD4+
(Citometría de Flujo)

Pruebas de Laboratorio

- Seguimiento



Carga Viral
(Biología Molecular)

Recuento de CD4+
(Citometría de Flujo)

Recuento de Linfocitos CD4+ en HIV+

- Evalúa la ubicación del paciente con respecto a la enfermedad y su situación clínica
- Parámetro complementario a la carga viral
- Valora el riesgo de infecciones oportunistas y necesidad de profilaxis
- Documenta los efectos de la terapia antirretroviral

POBLACIONES LINFOCITARIAS MAYORES

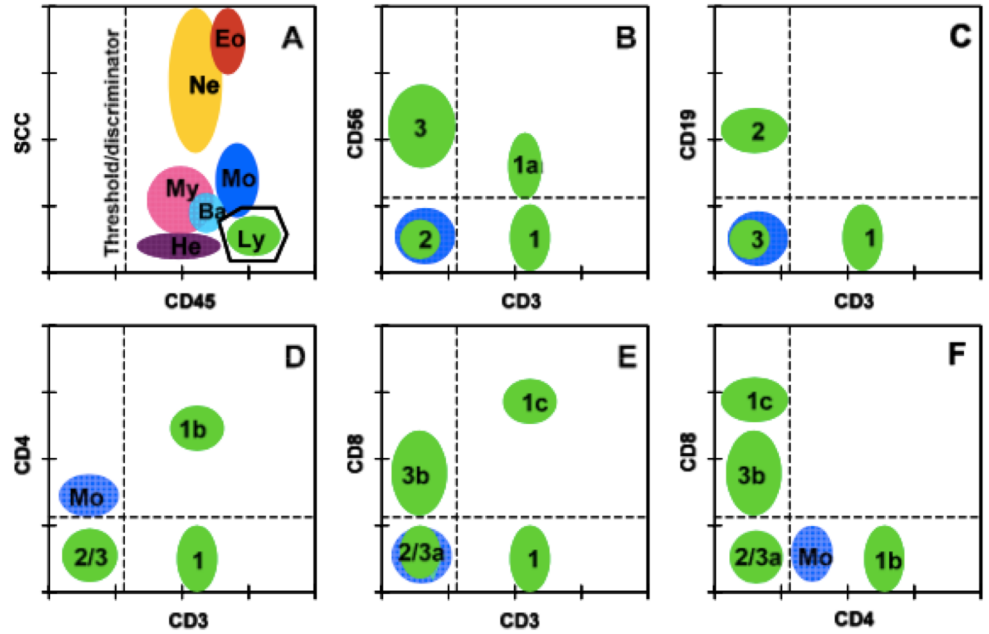


Figure 1. Typical Illustration of a Four-Color, Two-Tube Lymphocyte Subset Enumeration Assay Using Bivariate Histograms (Dot Plots). Tube 1 (panels A, B, and C) has been stained with a combination of CD3, CD19, CD45, and CD56 mAb. Tube 2 (panels D, E, and F) has been stained with a combination of CD3, CD4, CD8, and CD45 mAb. Panel A shows the CD45 vs. side scatter plot of ungated WBC with a threshold/discriminator set on $CD45^-$ events to exclude debris. Lymphocytes (Ly) are depicted in green, monocytes (MO) in blue, eosinophils (Eo) in red, neutrophils (Ne) in orange, basophils (Ba) in Cyan, hematogones or pre-B-cells (He) in purple, and myeloid blasts (My) in pink. Panels B to F show the analysis of the contents of the gate or region drawn around the lymphocytes in panel A, which may also include a small proportion of monocytes. The following lymphocyte subsets can be identified: $CD3^+$ T-cells (indicated with "1"), $CD3^+,56^+$ T-cell subset ("1a"), $CD3^+,4^+$ T-cell subset ("1b"), $CD3^+,8^+$ T-cell subset ("1c"), $CD19^+$ B-cells ("2"), $CD3^-,CD56^+,8^-$ NK cells ("3a") and $CD3^-$, $CD56^+,8^+$ NK cells ("3b").

Tubo	Anticuerpos	Propósito
1	CD3/CD19/CD56/CD45	Gate en CD45++ vs. SSC, recuento de LT,LB,NK
2	CD3/CD4/CD8/CD45	Gate en CD45++ vs. SSC, recuento de LT CD4+ y CD8+

- Eliminar detritus usando Threshold en CD45-
- Usar al menos un Anticuerpo repetido entre tubos
- Sumatoria de las poblaciones de LT, LB y NK debe estar entre 95%-105%

Cuantificación de CD4+

Medición de células presentes en el organismo, cuyo valor relativo y/o absoluto tendrá suma importancia para la toma de decisiones diagnósticas y/o terapéuticas.

Por Citometría de Flujo

Realizar gate en Linfocitos según el gráfico de CD45 vs SSC
Realizar gate en CD4+/CD3+
Realizar gate en CD8+/CD3+

Plataforma Única

Utiliza beads que permiten el cálculo matemático del valor absoluto en el mismo tubo donde se marca la muestra

Plataforma Doble

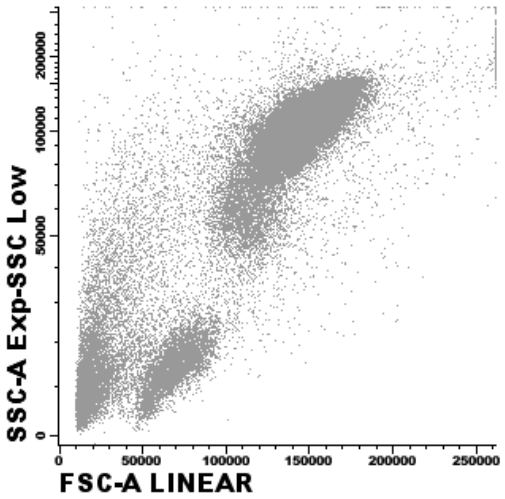
Utiliza el valor absoluto de Leucocitos realizado en un contador hematológico

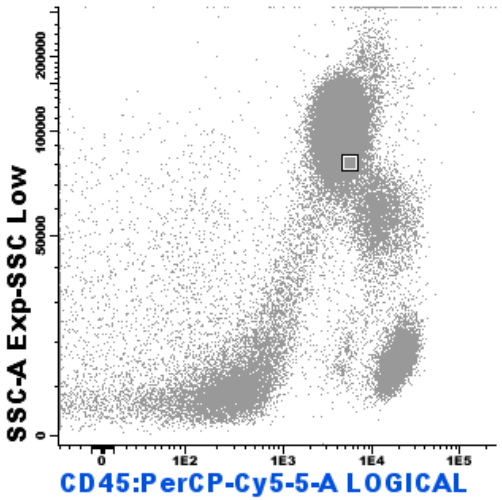
Técnica de marcación Plataforma doble

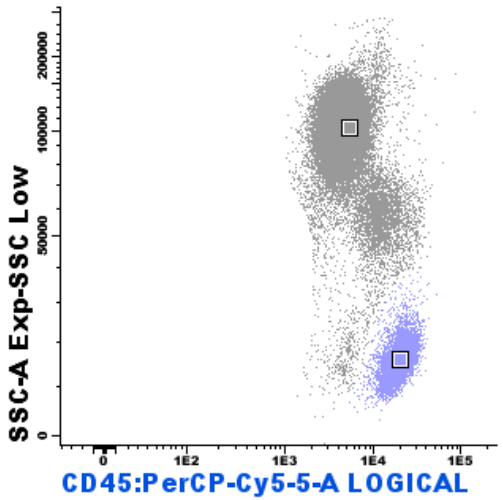
- Utilizar sangre entera, anticoagulada con EDTA o heparina, en tubos Vacutainer
- Procesamiento dentro de las 48hs de la obtenida la muestra, a temperatura ambiente (mejor heparina)
- Se colocan 50 uL de sangre en tubo apto para Citómetro con 5ul de cada anticuerpos monoclonales (CD45, CD3, CD4 y CD8) o bien 20ul de reactivo multitest
- Se incuba en cámara oscura durante 15-30 minutos a temperatura ambiente (18-22ºC)
- Se lisan los Glóbulos Rojos con 450 uL de FACS Lysing durante 15 minutos a temperatura ambiente
- Se adquiere en el Citómetro de Flujo (se puede guardar por 24hs)

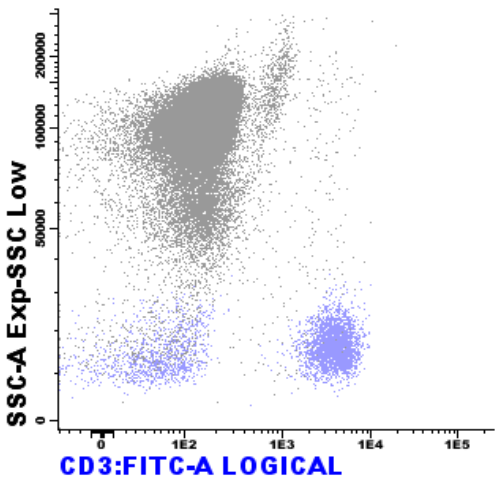
ANALIZAR CON GATE EN CD45+

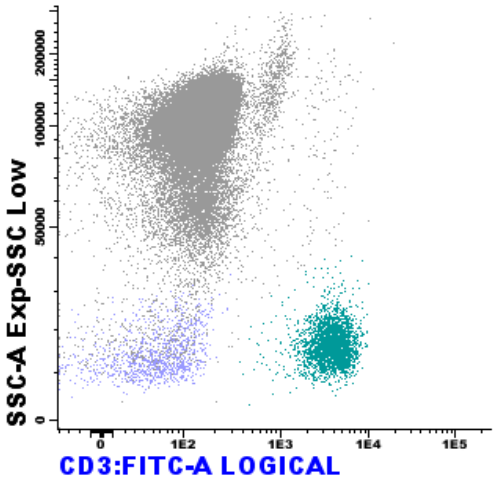
ANÁLISIS CON GATE CD45+

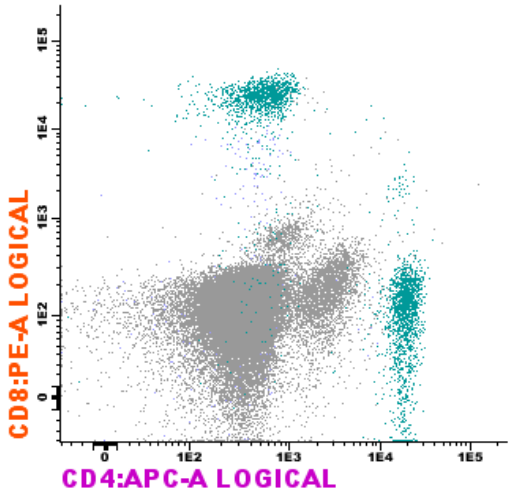




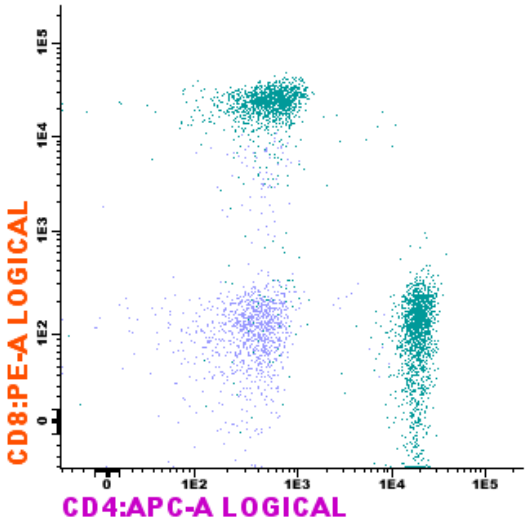


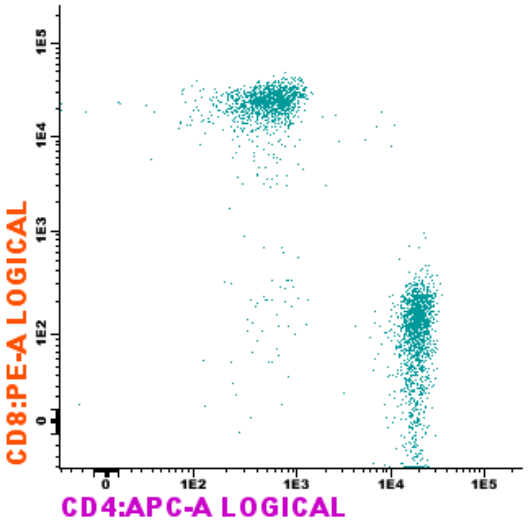


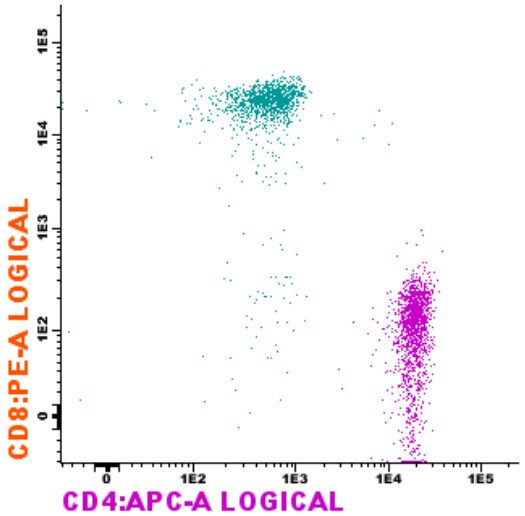


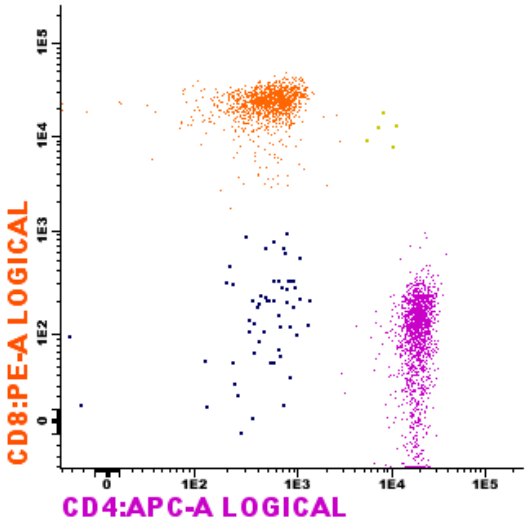


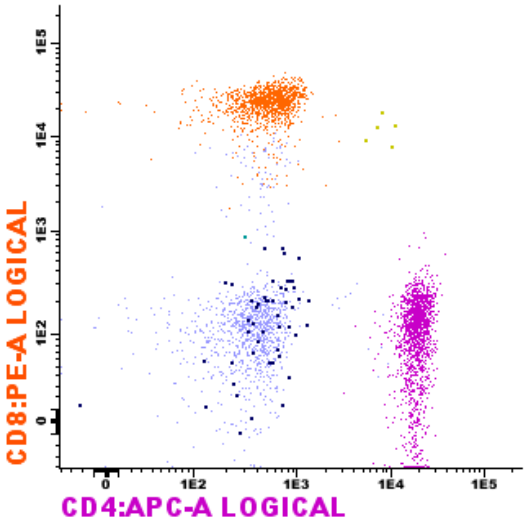
ANÁLISIS CON GATE CD45+











Población	Eventos	% Total	% Parcial	% Visibilidad
Events	55098	100,00	NA	0,00
Otros Events	51114	92,77	92,77	0,00
Linfocitos	3984	7,23	7,23	100,00
Otros Linfocitos	1063	1,93	26,68	26,68
Linfocitos T	2921	5,30	73,32	73,32
Otros Linfocitos T	1	0,00	0,03	0,03
Linf. T CD3+CD4+CD8-	1548	2,81	53,00	38,86
Linf. T CD3+CD4-CD8+	1317	2,39	45,09	33,06
Linf. T CD3+CD4-CD8-	50	0,09	1,71	1,26
Linf. T CD4+ CD8+	5	0,01	0,17	0,13

RESULTADOS

Población	Eventos	% Total	% Parcial	% Visibilidad
Events	55098	100,00	NA	0,00
Otros Events	51114	92,77	92,77	0,00
Linfocitos	3984	7,23	7,23	100,00
Otros Linfocitos	1063	1,93	26,68	26,68
Linfocitos T	2921	5,30	73,32	73,32
Otros Linfocitos T	1	0,00	0,03	0,03
Linf. T CD3+CD4+CD8-	1548	2,81	53,00	38,86
Linf. T CD3+CD4-CD8+	1317	2,39	45,09	33,06
Linf. T CD3+CD4-CD8-	50	0,09	1,71	1,26
Linf. T CD4+ CD8+	5	0,01	0,17	0,13

Linfocitos : 7,23%

CD4+ : 38,86%
CD8+ : 33,06%

Leucocitos : $5{,}680 \times 10^9$/L

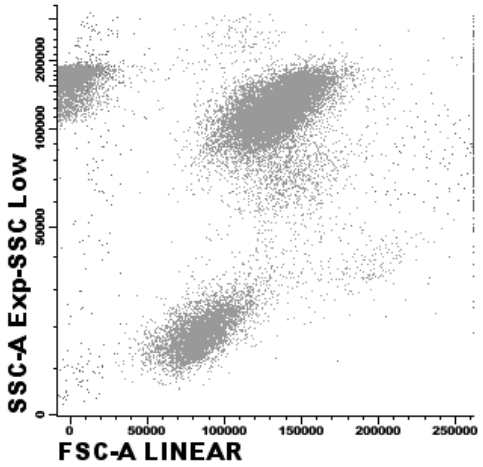
Linfocitos : 7,23%
Linfocitos : 411/uL

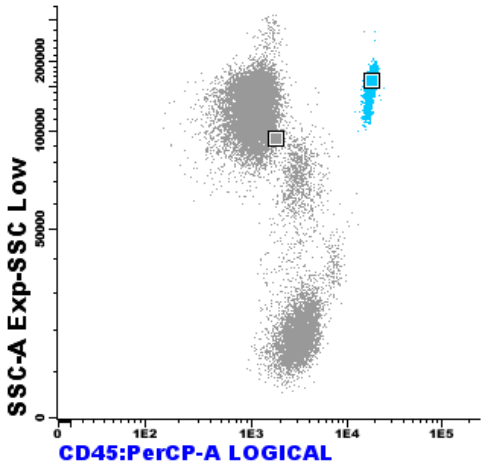
CD4+ : 160/uL
CD8+ : 136/uL

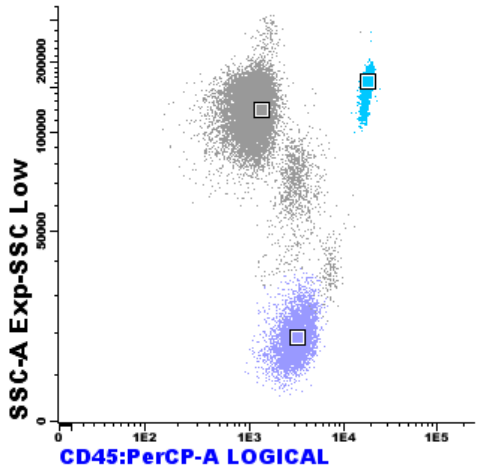
Técnica de marcación Plataforma única

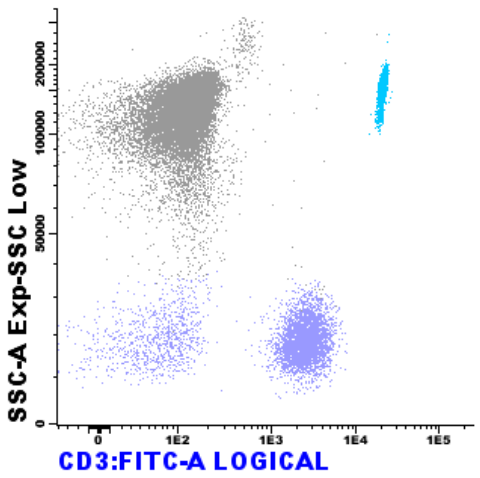
- Utilizar sangre entera, anticoagulada con EDTA o heparina, en tubos Vacutainer
- Procesamiento dentro de las 48hs de la obtenida la muestra, a temperatura ambiente (mejor heparina)
- Utilizar pipetas calibradas y con PIPETEO REVERSO
- Se colocan 50 uL de sangre en tubo Trucount y 20ul de reactivo multitest
- Se incuba en cámara oscura durante 15-30 minutos a temperatura ambiente (18-22ºC)
- Se lisan los Glóbulos Rojos con 450 uL de FACS Lysing durante 15 minutos a temperatura ambiente
- Se adquiere en el Citómetro de Flujo

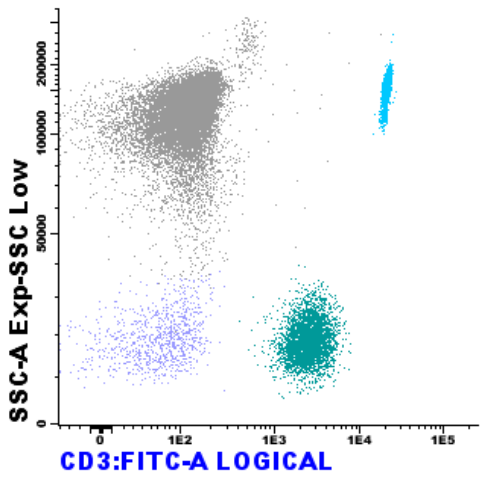
ANÁLISIS CON GATE CD45+ Y BEADS

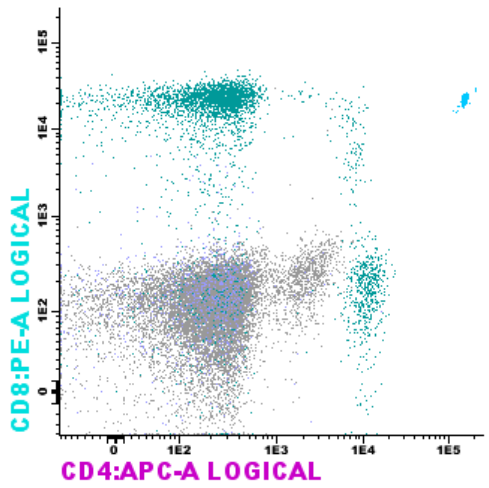




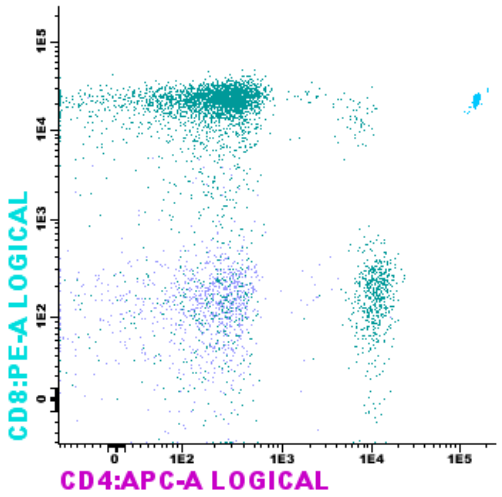


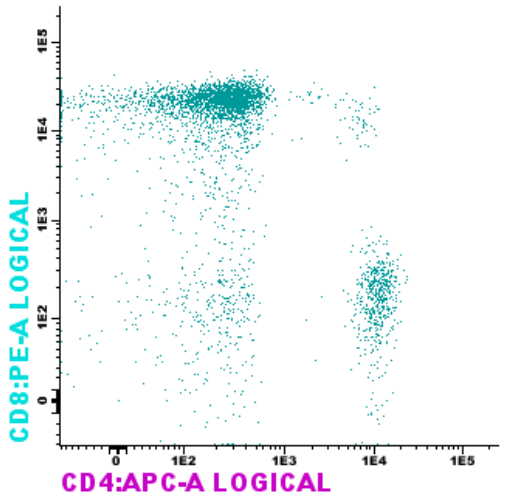


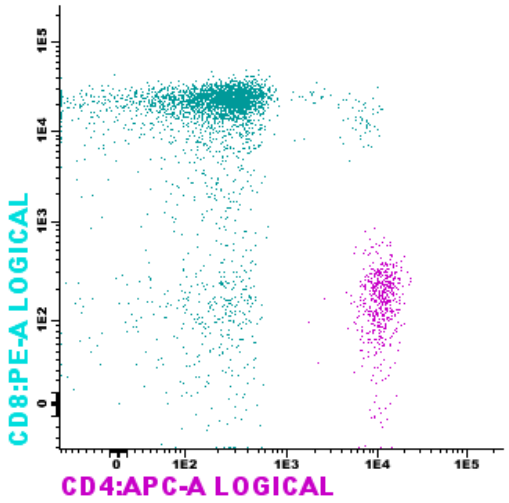


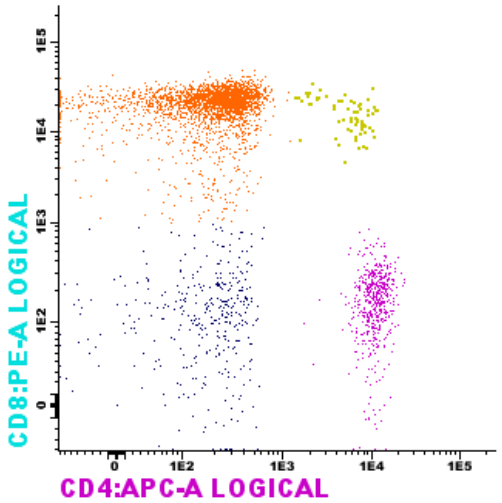


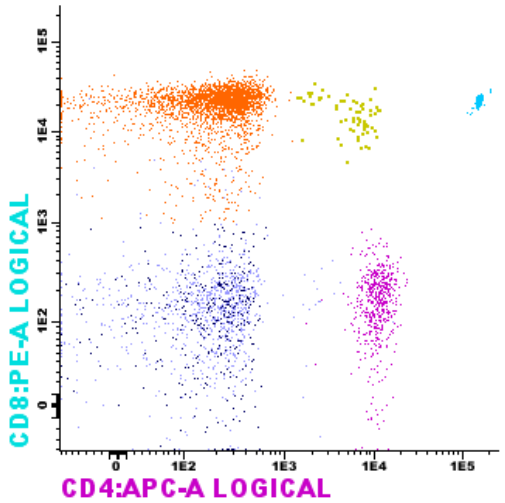
ANÁLISIS CON GATE CD45+ Y BEADS











Población	Eventos	% Total	% Parcial	% Visibilidad
Events	22706	100,00	NA	0,00
Otros Events	14737	64,90	64,90	0,00
Linfocitos	4596	20,24	20,24	100,00
Otros Linfocitos	879	3,87	19,13	19,13
Linfocitos T	3717	16,37	80,87	80,87
Otros Linfocitos T	0	0,00	0,00	0,00
Linf. T CD3+CD4+CD8-	529	2,33	14,23	11,51
Linf. T CD3+CD4-CD8+	2746	12,09	73,88	59,75
Linf. T CD3+CD4-CD8-	371	1,63	9,98	8,07
Linf. T CD4+ CD8+	71	0,31	1,91	1,54
Beads	3373	14,86	14,86	0,00

RESULTADOS

Población	Eventos	% Total	% Parcial	% Visibilidad
Events	22706	100,00	NA	0,00
Otros Events	14737	64,90	64,90	0,00
Linfocitos	4596	20,24	20,24	100,00
Otros Linfocitos	879	3,87	19,13	19,13
Linfocitos T	3717	16,37	80,87	80,87
Otros Linfocitos T	0	0,00	0,00	0,00
Linf. T CD3+CD4+CD8-	529	2,33	14,23	11,51
Linf. T CD3+CD4-CD8+	2746	12,09	73,88	59,75
Linf. T CD3+CD4-CD8-	371	1,63	9,98	8,07
Linf. T CD4+ CD8+	71	0,31	1,91	1,54
Beads	3373	14,86	14,86	0,00

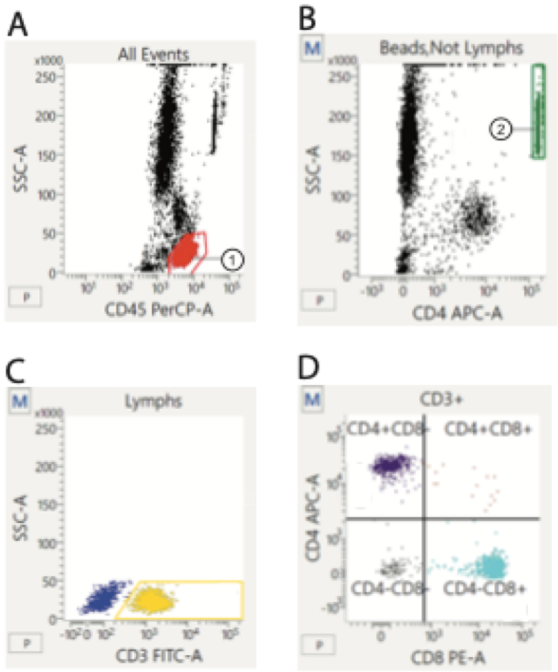
$$\text{Valor Absoluto} : \frac{\text{Nº de eventos en la región de interés}}{\text{Nº de eventos en la región de microesferas}} \times \frac{\text{Nº Total de microesferas agregadas}}{\text{Volumen de sangre agregado}}$$

$$\text{Valor Absoluto} : \frac{529}{3373} \times \frac{19745}{50\ \text{uL}}$$

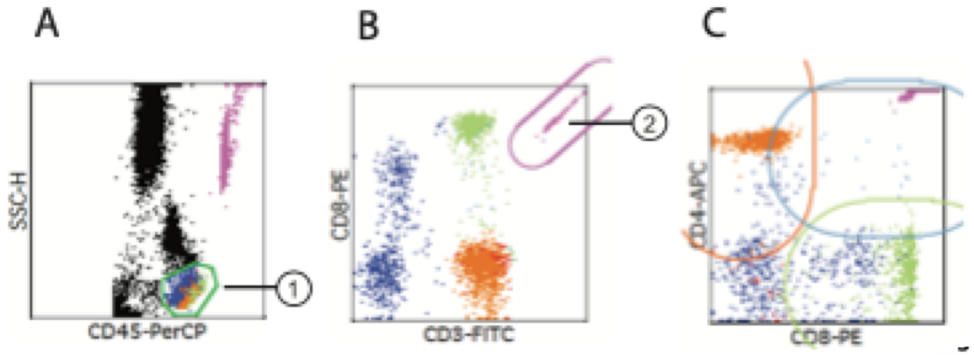
Valor Absoluto CD4+: 62 /uL

Análisis Automatizado

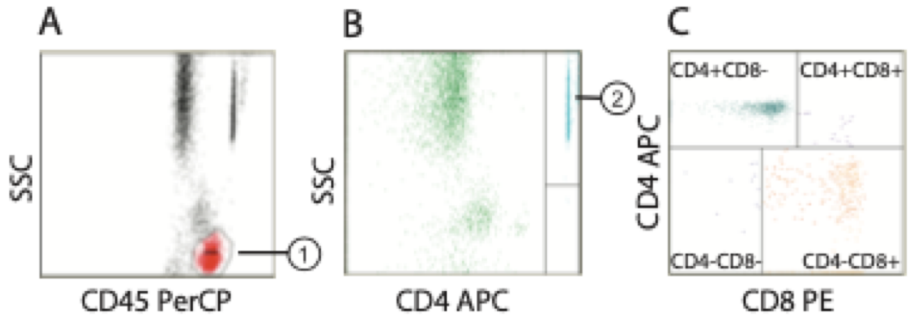
BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 in a BD Trucount tube (BD FACSLyric)



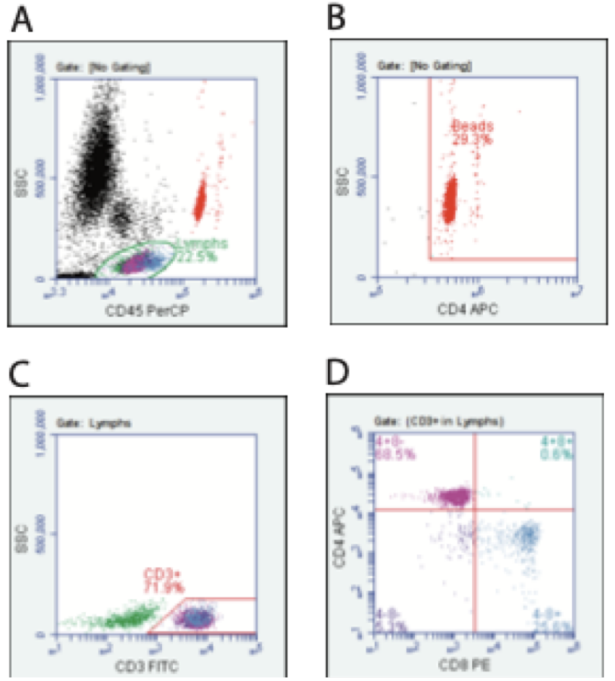
BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 in a BD Trucount tube (BD FACSCalibur)



BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 in a BD Trucount tube (BD FACSCanto II)



BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 in a BD Trucount tube (BD FACSVia)



CONSIDERACIONES EN RESULTADOS

El valor de CD3+ debe ser mayor
al 50% del gate de Linfocitos

- ✓ Muestra envejecida
- ✓ Contaminación del gate con Monocitos
- ✓ Problemas técnicos en la marcación
- ✓ Un aumento de los LB como en los procesos clonales, sugerir estudiar para otras patologías

La sumatoria de CD4+ y CD8+ debe dar el valor de CD3+ con una variabilidad < 5-10%

- ➢ Un aumento de las células T gamma-delta por ser CD3+ CD4- CD8- puede aumentar la variabilidad
- ➢ Un aumento de los LT alfa-beta dobles positivos puede aumentar la variabilidad
- ➢ Se debe sugerir estudiar para otras patologías

ELABORACIÓN DE INFORMES

Membrete de la Institución que realiza el estudio
Datos del Paciente: Nombre, Apellido y Fecha de Nacimiento ó el Codificado
Metodología Utilizada : Citometría de Flujo Plataforma Unica ó Plataforma Doble
Panel de Marcación Utilizado
Calidad de la muestra

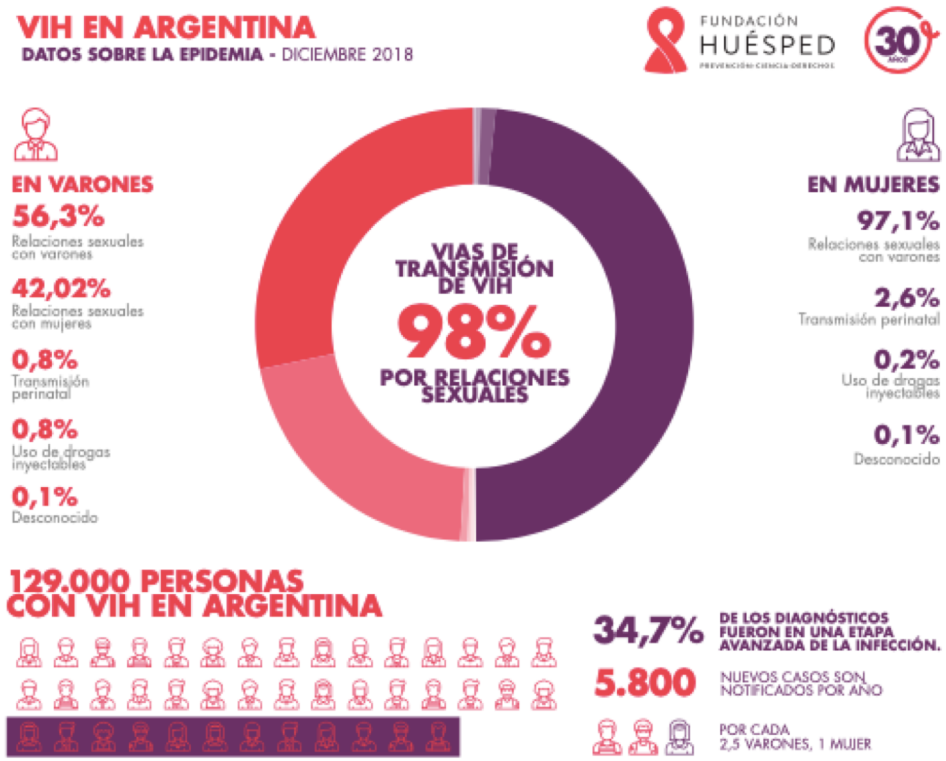
Resultados : Valores en % y Valores Absolutos de CD4 y CD8 (obligatorios)
Valores en % y Valores Absolutos de CD3 y de Linfocitos (opcional)

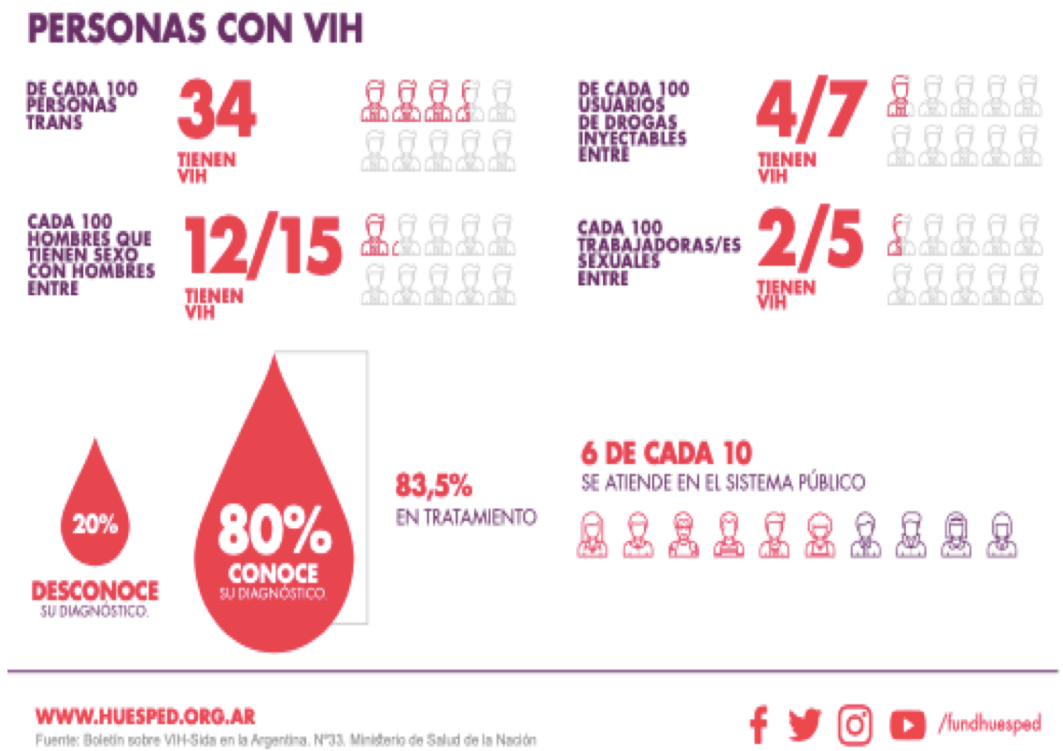
Firma del Bioquímico Responsable

Linfocitos CD4	Infección con síntomas
Cualquier valor	Tratar siempre
Linfocitos CD4	**Infección asintomática**
Igual o inferior a 350	Recomendar tratamiento
De 350 a 500	Recomendar en determinadas ocasiones: • Cirrosis hepática • Hepatitis C crónica • Hepatitis B con indicación de tratamiento • Carga viral >100.000 copias/mL • Porcentaje de CD4 <14% • Edad >55 años • Riesgo cardiovascular elevado • Neuropatía asociada al VIH
Por encima de 500	Diferir en general. Considerar en caso de: • Cirrosis hepática • Hepatitis C crónica • Hepatitis B con indicación de tratamiento • Carga viral >100.000 copias/mL • Porcentaje CD4 <14% • Edad >55 años • Riesgo cardiovascular elevado • Neuropatía asociada al VIH

Valores de Linfocitos CD4+ y decisiones terapeúticas

Datos HIV en Argentina





Muchas Gracias !!!

carolinacarrara@gmail.com